

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>A61K 39/00, 9/08, 9/107, 39/39</b>		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/38528</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>5. August 1999 (05.08.99)</b>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP99/00524</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>27. Januar 1999 (27.01.99)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 03 453.9 30. Januar 1998 (30.01.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BUSCHLE, Michael [DE/AT]; Hyrtlstrasse 35/1/1, A-2345 Brunn/Gebirge (AT). BIRNSTIEL, Max [CH/AT]; Skodagasse 14-16, A-1080 Wien (AT). SCHMIDT, Walter [DE/AT]; Steingasse 2a/16, A-1030 Wien (AT).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGELHEIM GMBH; Laudien, Dieter, Postfach 200, D-55216 Ingelheim (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, MX, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>	
<p>(54) Title: VACCINE FORMULATIONS</p> <p>(54) Bezeichnung: VAKZINEFORMULIERUNGEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to a vaccine containing one or more synthetic or highly purified natural peptides or proteins as antigen(s) as well as one or more adjuvants. The vaccine is presented as a solution or emulsion which is free from inorganic salt ions or has a low concentration of salt ions. Said vaccine preferably contains substances able to make it isotonic, especially sorbitol.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Eine Vakzine, enthaltend ein oder mehrere synthetische oder hochgereinigte natürliche Peptide oder Proteine als Antigen(e) sowie ein oder mehrere Adjuvantien liegt als Lösung bzw. Emulsion vor, die frei ist von anorganischen Salzionen bzw. eine niedrige Salzionenkonzentration aufweist. Bevorzugt enthält sie Substanzen mit der Fähigkeit, die Vakzine isotonisch zu machen, insbesondere Sorbit.</p>			

#### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

<b>AL</b>	Albanien	<b>ES</b>	Spanien	<b>LS</b>	Lcsotho	<b>SI</b>	Slowenien
<b>AM</b>	Armenien	<b>FI</b>	Finnland	<b>LT</b>	Litauen	<b>SK</b>	Slowakei
<b>AT</b>	Österreich	<b>FR</b>	Frankreich	<b>LU</b>	Luxemburg	<b>SN</b>	Senegal
<b>AU</b>	Australien	<b>GA</b>	Gabun	<b>LV</b>	Lettland	<b>SZ</b>	Swasiland
<b>AZ</b>	Aserbaidschan	<b>GB</b>	Vereinigtes Königreich	<b>MC</b>	Monaco	<b>TD</b>	Tschad
<b>BA</b>	Bosnien-Herzegowina	<b>GE</b>	Georgien	<b>MD</b>	Republik Mokdau	<b>TG</b>	Togo
<b>BB</b>	Barbados	<b>GH</b>	Ghana	<b>MG</b>	Madagaskar	<b>TJ</b>	Tadschikistan
<b>BE</b>	Belgien	<b>GN</b>	Guinea	<b>MK</b>	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	<b>TM</b>	Turkmenistan
<b>BF</b>	Burkina Faso	<b>GR</b>	Griechenland	<b>ML</b>	Mali	<b>TR</b>	Türkei
<b>BG</b>	Bulgarien	<b>HU</b>	Ungarn	<b>MN</b>	Mongolei	<b>TT</b>	Trinidad und Tobago
<b>BJ</b>	Benin	<b>IE</b>	Irland	<b>MR</b>	Mauritanien	<b>UA</b>	Ukraine
<b>BR</b>	Brasilien	<b>IL</b>	Israel	<b>MW</b>	Mafawî	<b>UG</b>	Uganda
<b>BY</b>	Belarus	<b>IS</b>	Island	<b>MX</b>	Mexiko	<b>US</b>	Vereinigte Staaten von Amerika
<b>CA</b>	Kanada	<b>IT</b>	Italien	<b>NE</b>	Niger	<b>UZ</b>	Usbekistan
<b>CF</b>	Zentralafrikanische Republik	<b>JP</b>	Japan	<b>NL</b>	Niederlande	<b>VN</b>	Vietnam
<b>CG</b>	Kongo	<b>KE</b>	Kenia	<b>NO</b>	Norwegen	<b>YU</b>	Jugoslawien
<b>CH</b>	Schweiz	<b>KG</b>	Kirgisistan	<b>NZ</b>	Neuseeland	<b>ZW</b>	Zimbabwe
<b>CI</b>	Côte d'Ivoire	<b>KP</b>	Demokratische Volksrepublik Korea	<b>PL</b>	Polen		
<b>CM</b>	Kamerun			<b>PT</b>	Portugal		
<b>CN</b>	China	<b>KR</b>	Republik Korea	<b>RO</b>	Rumänien		
<b>CU</b>	Kuba	<b>KZ</b>	Kasachstan	<b>RU</b>	Russische Föderation		
<b>CZ</b>	Tschechische Republik	<b>LC</b>	St. Lucia	<b>SD</b>	Sudan		
<b>DE</b>	Deutschland	<b>LI</b>	Liechtenstein	<b>SE</b>	Schweden		
<b>DK</b>	Dänemark	<b>LK</b>	Sri Lanka	<b>SG</b>	Singapur		
<b>EE</b>	Estland	<b>LR</b>	Liberia				

## VAKZINEFORMULIERUNGEN

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Gebiet  
5 der Vakzinen.

Die immunogene Wirkung von traditionellen Vakzinen  
beruht zumeist auf abgetöteten oder abgeschwächten  
Krankheitserregern. In den traditionellen Vakzinen  
wirken die Verunreinigungen der Vakzine selbst oder  
10 andere Komponenten von Organismen als Adjuvantien, die  
die immunogene Wirkung des eigentlichen Antigens  
verstärken und/oder verlängern. Z.B. enthält der  
Diphtherie-Tetanus-Keuchhusten-Impfstoff zwei potente,  
von der Ganzzell-Keuchhusten-Vakzine stammende  
15 Adjuvantien (LPS = Lipopolysaccharid sowie PT =  
Pertussistoxin); ebenso haben die Ganzzell-Typhus- und  
Choleraimpfstoffe potente Adjuvantien (LPS sowie  
Choleratoxin); die BCG-Vakzine (Bacillus Calmette  
Guerin) hat starke nicht-spezifische  
20 immunstimulatorische Wirkungen.

Im Gegensatz zu den komplexen traditionellen  
Impfstoffen enthalten die modernen Vakzinen  
synthetische, rekombinante oder hochgereinigte Antigene  
in Form von Proteinen oder Peptiden. Diese Vakzinen  
25 gelten als sicherer, weisen jedoch im allgemeinen den  
Nachteil geringerer Immunogenität auf. Um diesen  
Nachteil zu kompensieren, werden den Vakzinen  
Adjuvantien beigegeben, um die spezifische Immunantwort  
auf Antigene zu verstärken und verlängern. Einige

Adjuvantien haben die Eigenschaft, die T-Zellproliferation und die zelluläre Immunantwort zu verstärken.

Die meisten der bisher verwendeten Adjuvantien weisen 5 jedoch Nebeneffekte auf, auch erfüllen diese Adjuvantien nicht die Anforderungen, die an die Sicherheit von Adjuvantien gestellt werden, wie Stabilität im Hinblick auf Adjuvanswirkung, minimale Toxizität ohne Wechselwirkung mit dem Antigen, ferner 10 Abbaufähigkeit im Organismus sowie Fehlen einer eigenen immunogenen Wirkung.

Eine Übersicht von gängigen Adjuvantien, die bisher für Vakzinen in Betracht gezogen wurden, wird von Vogel, 1995, und von Gupta und Siber, 1995, gegeben. Dazu 15 zählen: anorganische Adjuvantien in Gelform (Aluminiumhydroxid/Aluminiumphosphat, Calciumphosphat); bakterielle Adjuvantien, wie Monophosphoryllipid A und Muramylpeptide, teilchenförmige Adjuvantien, wie die sog. ISCOMS („immunostimulatory complexes“), Liposomen 20 und bioabbaubare Mikrosphären, Adjuvantien auf der Grundlage von Ölemulsionen und Emulgatoren, wie Freund's Adjuvans oder IFA („Incomplete Freund's Adjuvans“), Saponine (wie QS-21), Squalen; synthetische Adjuvantien, wie nicht-ionische Block-Copolymere, 25 Muramylpeptidanaloge, synthetisches Lipid A, synthetische Polynukleotide und polykationische Adjuvantien, wie Polyarginin oder Polylysin (WO 97/30721).

Die Wahl eines Adjuvans stellt in der Regel einen 30 Kompromiß dar, der das Ergebnis einer Abwägung zwischen

Toxizität und Adjuvanswirkung der jeweiligen Substanz ist.

Bei Vakzineformulierungen wurde bisher im allgemeinen Bedacht auf Isotonizität genommen, die gängigen

5 Vakzinformulierungen liegen üblicherweise in einer Salzkonzentration vor, die etwa 150 mM NaCl (ca. 300 mosmol/l) entspricht. Gängige Pufferformulierungen sind PBS und HBS (Phosphat-gepufferte bzw. HEPES-gepufferte Salzlösung); z.B. wurde für eine ISCOM-

10 Vakzine PBS pH 7.4 vorgeschlagen (Barr und Mitchell, 1996).

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, eine Vakzineformulierung bereitzustellen, die die Wirkung von Vakzinen auf der Grundlage von Antigenen in

15 Form von Peptiden oder Proteinen verstärkt.

Es wurde überraschend festgestellt, daß die immunogene Wirkung einer adjuvanshältigen Vakzine auf Peptidbasis gesteigert wird, wenn die Vakzineformulierung eine niedrige Salzionenkonzentration aufweist bzw. frei von

20 Salzen ist.

Die Erfindung betrifft somit eine Vakzine, enthaltend ein oder mehrere synthetische oder hochgereinigte natürliche Peptide oder Proteine als Antigen(e) sowie ein oder mehrere Adjuvantien. Die Vakzine ist dadurch gekennzeichnet, daß sie als Lösung oder Emulsion vorliegt, die frei von anorganischen Salzionen ist bzw. eine niedrige Salzionenkonzentration aufweist.

Im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Vakzine wird unter „niedrige Salzionenkonzentration“ eine

Konzentration verstanden, die gleich oder niedriger ist als ca. 50% der Salzkonzentration einer isotonischen Lösung, was etwa ca. 75 mM Kochsalzlösung entspricht.

Bei der Berechnung der Ionenkonzentration ist zu 5 berücksichtigen, daß im Fall der Verwendung von Peptid- bzw. Proteinantigenen, die als solche eine Ladung aufweisen, diese Ladung nicht in Rechnung gestellt wird.

Bevorzugt ist die Vakzine im wesentlichen frei von 10 Natrium-, Chlorid- und Phosphationen, besonders bevorzugt ist sie im wesentlichen frei von sämtlichen anorganischen Salzionen („im wesentlichen frei“ bedeutet, daß der Vakzine keine Salze zugesetzt wurden, daß jedoch gegebenenfalls von Reagentien stammende 15 Verunreinigungen oder Spuren von Ionen enthalten sein können; ebenfalls nicht eingerechnet werden von Adjuvantien stammende Ionen, z.B. bei Verwendung anorganischer Adjuvantien).

Für den Fall, daß die Vakzine, z.B. von Pufferlösung 20 stammende, Phosphationen enthält, ist sie bevorzugt frei von Natrium- und Chloridionen. Für den Fall, daß sie Natrium- und/oder Chloridionen enthält, ist sie bevorzugt frei von Phosphationen.

In einer Ausführungsform der Erfindung enthält die 25 Vakzine Antigen und Adjuvans in salzfreiem Medium, z.B. in destilliertem Wasser.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Vakzine eine oder mehrere wasserlösliche bzw. wasseremulgierbare Substanzen, die

die Fähigkeit haben, die Vakzine isotonisch zu machen und deren immunogene Wirkung zu verstärken.

Diese Substanzen werden im folgenden als "isotonisch machende Substanzen" bezeichnet. Isotonisch machende 5 Substanzen haben aufgrund ihrer Molekülgröße und molekularen Struktur die Eigenschaft, den physiologischen osmotischen Druck erzeugen zu können.

Bevorzugt sind die isotonisch machenden Substanzen ausgewählt aus der Gruppe der Kohlenhydrate (Zucker, 10 Zuckeralkohole, Oligosaccharide, Polysaccharide), mehrwertige Alkohole, Aminosäuren oder Lipide.

Bevorzugt ist die isotonisch machende Substanz ein Zucker, insbesondere ein Mono- oder Disaccharid wie Maltose, Fruktose, Galaktose oder Saccharose, oder ein 15 Zuckeralkohol, wie Sorbit oder Mannit.

Als Aminosäuren kommen können isotonische, salzfreie Aminosäurelösungen, wie sie z.B. in der parenteralen Ernährung verwendet werden, in Betracht. Derartige Lösungen sind kommerziell erhältlich (z.B. von Leopold, 20 Graz, Österreich); erforderlichenfalls können diese, falls sie Salzionen enthalten, entsalzt werden. Alternativ kommen auch isotonische, salzfreie Lösungen, die einzelne, bevorzugt wasserlösliche, Aminosäuren enthalten, in Frage.

25 Als Lipide kommen insbesondere isotonische, salzfreie Fettemulsionen in Betracht, wie sie z.B. in der parenteralen Ernährung verwendet werden. Derartige Emulsion sind kommerziell erhältlich (z.B. von Leopold, Graz, Österreich); erforderlichenfalls können diese,

falls sie Salzionen enthalten, entsalzt werden. Es kommen auch langkettige Kohlenwasserstoffe in Frage (z.B. Paraffinöle), ferner höhere Fettsäuren wie Linolsäure, Linolensäure oder Palmitinsäure,

5      Fettsäureester wie Triglyzeride.

Die isotonisch machende Substanz liegt, je noch Molekulargewicht, bevorzugt in einer Konzentration vor, so daß die resultierende Lösung isotonisch oder leicht hypotonisch ist.

10     Bevorzugte Zucker- bzw. Zuckeralkoholkonzentrationen liegen im Bereich von ca. 200 - 400 mM, insbesondere im Bereich von 250 - 300 mM. Die Osmolarität der Lösung beträgt zweckmäßig zwischen 200 - 400 mosmol/l, die Lösung kann aber auch stark hypotonisch sein.

15     Aminosäurelösungen sollten bevorzugt eine Osmolarität zwischen 200 - 400 mosmol/l aufweisen, können aber auch stark hypotonisch sein.

Lipidemulsionen weisen ebenfalls bevorzugt eine Osmolarität zwischen 200 - 400 mosmol/l auf, können aber auch stark hypotonisch sein.

20     Zusätzlich zur isotonisch machenden Substanz enthält die Lösung, in der die erfindungsgemäße Vakzine vorliegt, gegebenenfalls eine Puffersubstanz. Dafür kommen in erster Linie HEPES (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]), oder TRIS (Tris[hydroxymethyl]aminomethane) in Betracht. Eine Puffersubstanz kann erforderlich sein, um die Vakzine auf einen physiologischen pH-Wert einzustellen, wenn die primäre Lösung vom physiologischen Wert abweicht.

Bezüglich der Peptid- bzw. Proteinantigene unterliegt die erfindungsgemäße Vakzine keinerlei Beschränkungen. Bei den Antigenen kann es sich um natürlich vorkommende immunogene Proteine, z.B von viralen oder bakteriellen Erregern stammende Proteine bzw. deren Fragmente oder zelluläre Abbauprodukte in Form von Peptiden handeln; oder um Tumorantigene bzw. Fragmente davon. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Antigen ein Tumorantigen bzw. ein davon abgeleitetes natürliches oder synthetisches Peptid, in diesem Fall liegt die Vakzine als Tumorvakzine vor.

Die Menge an wirksamem Antigen in der erfindungsgemäßen Vakzine kann über einen breiten Bereich variieren. Die Menge an Peptid hängt u.a. von der Verabreichungsart und der jeweiligen Formulierung ab. Die zu verabreichende Menge an Peptid kann ca. 0.1 µg bis ca. 10000 µg pro Vakzinierungs dosis betragen, im allgemeinen 1.0 µg bis ca. 1000 µg, insbesondere ca. 10 µg bis ca. 500 µg.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Adjuvans eine Substanz, wie sie in der WO 97/30721, auf deren Offenbarung hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, als Zusatz für Protein- bzw. Peptidvakzine vorgeschlagen wurde, bevorzugt ein Polykation, wie Polyarginin oder Polylysin, das gegebenenfalls modifiziert ist, z.B. mit einem Zuckerrest.

Als Adjuvans kommen ferner grundsätzlich sämtliche der oben genannten, für Vakzinen auf Peptid- oder Proteinbasis bekannte Adjuvantien in Betracht. z.B.

anorganische Adjuvantien in Gelform  
(Aluminiumhydroxid/Aluminiumphosphat, Warren et al., 1986; Calciumphosphat, Relyvelt, 1986); bakterielle Adjuvantien wie Monophosphoryllipid A (Ribi, 1984;

5 Baker et al., 1988) und Muramylpeptide (Ellouz et al., 1974; Allison und Byars, 1991; Waters et al., 1986); teilchenförmige Adjuvantien, wie die sog. ISCOMS („immunostimulatory complexes“, Mowat und Donachie, 1991; Takahashi et al., 1990; Thapar et al., 1991),

10 Liposomen (Mbawuike et al. 1990; Abraham, 1992; Phillips and Emili, 1992; Gregoriadis, 1990) und bioabbaubare Mikrosphären (Marx et al., 1993); Adjuvantien auf der Grundlage von Ölemulsionen und Emulgatoren, wie Freund's Adjuvans oder IFA

15 („Incomplete Freund's Adjuvans“ (Stuart-Harris, 1969; Warren et al., 1986), SAF (Allison and Byars, 1991), Saponine (wie QS-21; Newman et al., 1992), Squalen/Squalan (Allison and Byars, 1991); synthetische Adjuvantien, wie nicht-ionische Block-Copolymere

20 (Hunter et al., 1991), Muramylpeptidanaloge (Azuma, 1992), synthetisches Lipid A (Warren et al., 1986; Azuma, 1992), synthetische Polynukleotide (Harrington et al., 1978) und polykationische Adjuvantien (WO 97/30721).

25 Dem Fachmann kann anhand der oben genannten Fachliteratur geeignete Antigen/Adjuvantienformulierungen definieren und, davon ausgehend, eine isotonische machende Substanz ermitteln, die geeignet ist, die Wirksamkeit der

30 Formulierung zu steigern bzw., bei gleicher Wirksamkeit, eine Verringerung des Adjuvansanteils in

der Formulierung zu senken, was bei Adjuvantien mit Nebeneffekten einen entscheidenden Vorteil bietet.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde überraschend festgestellt, daß eine salzfreie, mit Sorbit isotonisch

5 gemachte Tumorvakzine, enthaltend ein MHC-bindendes, von einem Tumorantigen abgeleitetes Peptid sowie Polyarginin als Adjuvans, gegenüber einer hinsichtlich Peptid/Adjuvans identischen, herkömmlich formulierten, d.h. eine isotonische Salzkonzentration enthaltenden

10 Tumorvakzine eine stärkere Antitumoraktivität aufweist. Es wurde festgestellt, daß die Peptide zusammen mit dem Adjuvans in Sorbitlösung besser löslich sind als in herkömmlichem PBS Puffer. Ohne auf die Theorie festgelegt sein zu wollen, dürfte die verbesserte

15 Wirkung der Vakzine, neben der verbesserten Löslichkeit, darauf zurückzuführen sein, daß die Interaktion zwischen Peptid und Adjuvans erleichtert und damit die Wirkung des Adjuvans verstärkt wird. Gegebenfalls ist die verbesserte Wirkung der Vakzine

20 außerdem auf eine Co-Adjuvans-Wirkung der isotonisch machenden Substanz, z.B. Sorbit, zurückzuführen, d. h. diese Substanz (Sorbit) hat als solche eine gewisse Adjuvanswirkung, die die Wirkung des primären Adjuvans verstärkt.

25 Um eine Vakzine optimal zu formulieren, wird zweckmäßig wie folgt vorgegangen: ausgehend von einem definierten Antigen, das die gewünschte Immunantwort hervorrufen soll, wird in einem ersten Schritt ein auf das Antigen abgestimmtes Adjuvans ermittelt, wie in der

30 Fachliteratur, insbesondere in der WO 97/30721, beschrieben. In einem nächsten Schritt wird die Vakzine

dahingehend optimiert, daß der Antigen/Adjuvansmischung bei ansonsten identischer Zusammensetzung unterschiedliche isotonisch machende Substanzen im Sinne der Definition der vorliegenden Erfindungen, 5 bevorzugt Zucker und/oder Zuckeralkohole, in isotonischer bzw. leicht hypotonischer Konzentration zugesetzt werden und die Lösung auf einen physiologischen pH-Wert im Bereich von pH 4.0 bis 10.0, insbesondere 7.4, gebracht wird. Dann wird in einem 10 ersten Schritt, wie im Beispiel der vorliegenden Anmeldung beschrieben, festgestellt, welche Substanzen, bzw. in welcher Konzentration, die Löslichkeit der Antigen/Adjuvanz zusammensetzung gegenüber einer herkömmlichen, salzgepufferten Lösung verbessern. Die 15 Verbesserung der Löslichkeitseigenschaften durch einen Substanz-Kandidaten ist ein erster Hinweis darauf, daß diese Substanz eine Steigerung der immunogenen Wirkung der Vakzine hervorzurufen imstande ist.

Da eine der möglichen Voraussetzungen für eine 20 Steigerung der zellulären Immunantwort eine erhöhte Bindung des Antigens an APCs (Antigen päsentierende Zellen) ist, kann in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob die Substanz eine solche Steigerung hervorruft. Dazu kann analog vorgegangen werden wie bei 25 der Definition des Adjuvans, z. B. indem APCs mit fluoreszenzmarkiertem Peptid bzw. Protein, Adjuvans und isotonisch machende Substanz inkubiert werden. Eine durch die Substanz bewirkte erhöhte Aufnahme bzw. Bindung des Peptids an APCs kann durch Vergleich mit 30 Zellen, die mit Peptid und Adjuvans allein bzw. mit einer Peptid/Adjuvanz zusammensetzung, die in

herkömmlicher Salzpufferlösung vorliegt, versetzt wurden, mittels Durchflußzytometrie bestimmt werden.

In einem zweiten Schritt können die Substanz-Kandidaten *in vitro* daraufhin untersucht werden, ob und in welchem

5 Ausmaß ihre Gegenwart die Präsentation eines Peptids auf APCs zu steigern vermag, wobei nach den in der WO 97/30721 für die Testung von Peptiden beschriebenen Methoden die MHC-Konzentration auf den Zellen gemessen werden kann.

10 Eine weitere Möglichkeit zur Testung der Effizienz einer Formulierung ist die Verwendung eines *in vitro* Modellsystems. Hierbei werden APCs zusammen mit Adjuvans, Peptid und Kandidatensubstanz inkubiert und die relative Aktivierung eines T-Zellklons, der das

15 verwendete Peptid spezifisch erkennt, gemessen (Coligan et al., 1991; Lopez et al., 1993)

Die Effizienz der Formulierung kann gegebenenfalls auch über die zelluläre Immunantwort durch den Nachweis einer "delayed-type hypersensitivity" (DTH)-Reaktion in

20 immunisierten Tieren gezeigt werden.

Letztlich wird die immunmodulatorische Wirkung der Formulierung im Tierversuch gemessen. Im Falle einer Tumorvakzine, wie im vorliegenden Beispiel, können u.a. etablierte Tumormodelle, bei denen von Immunzellen erkannte Peptidsequenzen bekannt sind, eingesetzt werden. Die Vakzine, enthaltend bei konstanter Peptid/Adjuvans-Zusammensetzung unterschiedliche Puffersubstanzen, wird den Versuchstieren appliziert. Der Schutz vor Tumorwachstum ist ein Maß für die

25 30 Wirksamkeit einer Tumorvakzine.

## Beispiel

Die Versuche wurden durchgeführt, wie in der WO 97/30721 beschrieben.

a) DBA/2 Mäuse wurden mit einem Gemisch aus 100 µg MHC Klasse I bindendem Peptid SYFPETHI (Bezeichnung "P815 JAK1") und 75 µg Polyarginin (Polymerisationsgrad 70, SIGMA Chemicals, St. Louis MO) pro Tier dreimal in je einwöchigem Abstand geimpft. Die Peptid/Adjuvantslösung wurde in Sorbitlösung (270 mM Sorbit, 5 mM HEPES) oder phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, GIBCO BRL) verabreicht. Kontrollmäuse erhielten entweder 100 µg Peptid/Tier ohne Adjuvants in Sorbitpuffer oder wurden nicht vakziniert. Eine Woche nach der letzten Vakzinierung wurden  $10^4$  viable Tumorzellen injiziert und Tumorwachstum wöchentlich festgehalten.

Das Ergebnis der Versuche ist in Fig. 1 dargestellt. Die Abbildung zeigt den Vergleich der Effizienz der P815 JAK1-Vakzine in Sorbitlösung gegen eine Vakzine in gepufferter, isotonischer Salzlösung im Tiermodell. Es zeigte sich, daß Tiere, die die Vakzine in Sorbitlösung erhielten, besser geschützt sind als Mäuse, die mit Peptid/polyArginin in PBS geimpft wurden.

b) Für die Löslichkeitsversuche wurden Gemische aus fluoreszenzmarkiertem Peptid LFEAIEGFI oder GYKDGYEYI hergestellt: 100 µg fluoreszenzmarkiertes Peptid wurde mit 75 µg Polyarginin (Arg; Polymerisationsgrad 70, SIGMA Chemicals, St. Louis MO) entweder in Sorbitlösung oder HEPES-gepufferter Kochsalzlösung (HBS: 20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl) versetzt. Nach drei Stunden wurde

die Menge an gelöster Fluoreszenz durch Bestimmung der Extinktion bei 490 nM gemessen. Als Testprotein wurde das Green Fluorescent Protein verwendet.

Fig. 2 und Fig. 3 zeigen den Vergleich der Löslichkeit der Komplexe nach Mischung in gepufferter Salzlösung oder Sorbitlösung. Die beiden fluoreszenzmarkierten Peptide (Fig. 2A und Fig. 2B) und das Green Fluorescent Protein (GFP; ca. 30 Kd; Fig. 3) wurden in diesen Versuch einbezogen. Durch Anmischung der Vakzine in 10 Sorbitlösung ergab sich eine deutlich verbesserte Löslichkeit und Recovery (erhöhte Fluoreszenz) sowohl mit den beiden getesteten Peptiden als auch mit GFP.

## Literatur

Abraham, E., 1992, Vaccine 10, 461-468

5 Allison, A.C., und Byars, N.E., 1991, Mol Immunol 28, 279-284

Azuma, I., 1992, Vaccine 10, 1000-1004

Baker, P.J., et al., 1988, Infect Immun 56, 3064-3066

Coligan, J.E. et al., 1991, Current Protocols in  
10 Immunology, Wiley, New York

Ellouz, F., et al., 1974, Biochem Biophys Res Commun 59, 1317-1325

Gupta, R.K. und Siber G.R., 1995, Vaccine 13, 1263-1276

Gregoriadis, G., 1990, Immunol Today 11, 89-97

15 Harrington, D.G., et al., 1978, Infect Immun 24, 160-166

Hunter, R., et al., 1991, Vaccine 9, 250-255

Lopez, J.A., et al., 1993, Eur. J. Immunol. 23, 217-223

Marx, P.A., et al., 1993, Science 28, 1323-1327

20 Mbawuike, I.N., et al., 1990, Vaccine 8, 347-352

Mowat, A.M., und Donachie, A.M., 1991, Immunol Today 12, 383-385

Newman, M.J., et al., 1992, *J Immunol* 148, 2357-2362

Phillips, N.C. und Emili, A, 1992, *Vaccine* 10, 151-158

Rammensee, H.G., et al., 1995, *Immunogenetics* 41, 178-228

5 Relyvelt, E.H., 1986, *Develop Biol Standard*, 65, 131-136

Ribi, E., 1984, *J Biol Res Mod*, 3, 1-9

Stuart-Harris, C.H., 1969, *Bull WHO* 41, 617-621

Takahashi, H., et al., 1990, *Nature* 344, 873-875

10 Thapar, M.A., et al., 1991, *Vaccine* 9, 129-133

Vogel, F. R. 1995, *Ann N Y Acad Sci* 754, 153-160

Warren, H.S., et al., 1986, *Ann Rev Immunol* 4, 369-388

Waters, R.V., et al., 1986, *Infect Immun* 52, 816-825

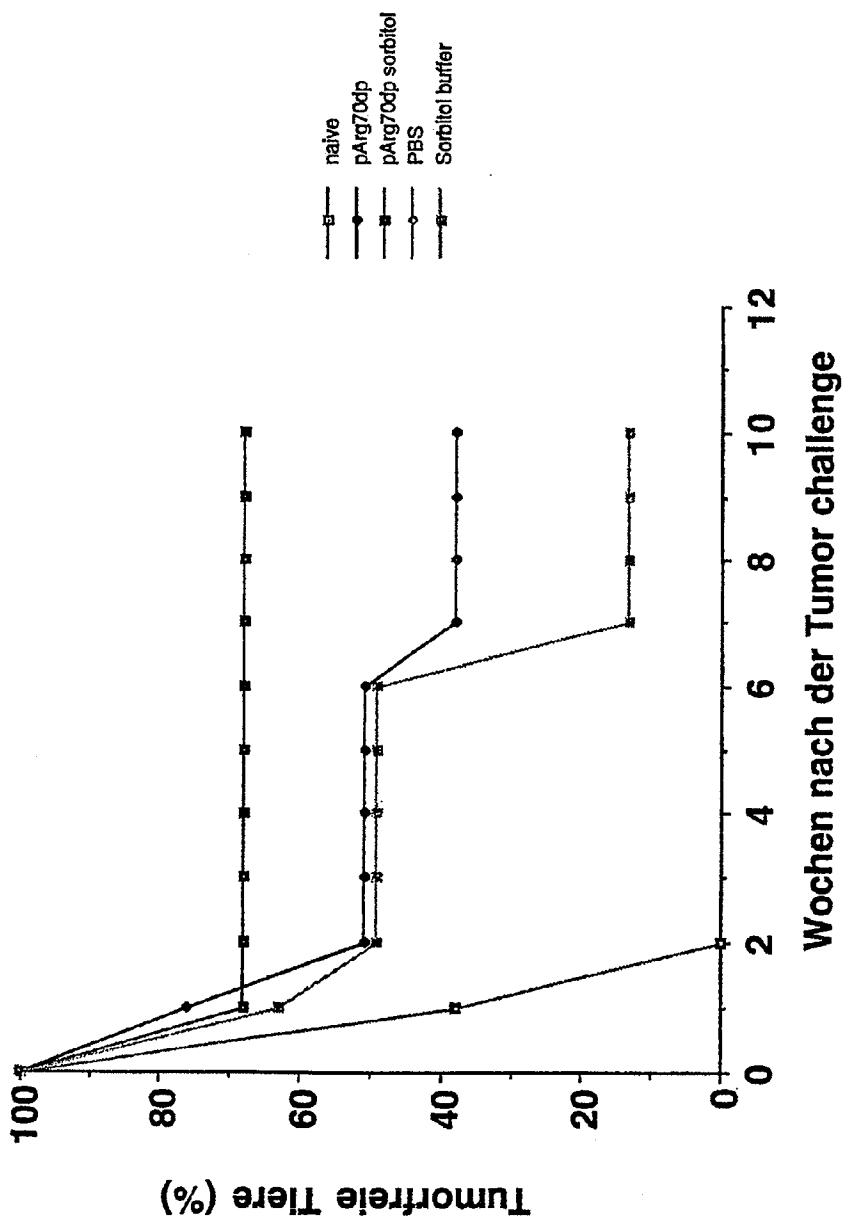
## Patentansprüche

1. Vakzine, enthaltend ein oder mehrere synthetische oder hochgereinigte natürliche Peptide oder Proteine als Antigen(e) sowie ein oder mehrere Adjuvantien, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Lösung bzw. Emulsion vorliegt, die frei von anorganischen Salzionen ist bzw. eine niedrige Konzentration anorganischer Ionen aufweist.
- 10 2. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie im wesentlichen frei von Natrium- und Chlorid- und/oder frei von Phosphationen ist.
- 15 3. Vakzine nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie im wesentlichen frei von sämtlichen anorganischen Salzionen ist.
- 20 4. Vakzine nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine oder mehrere wasserlösliche bzw. wasseremulgierbare Substanzen enthält, die die Fähigkeit haben, die Vakzine isotonisch zu machen und deren immunogene Wirkung zu verstärken.
- 25 5. Vakzine nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die isotonisch machende Substanz ausgewählt ist aus der Gruppe Kohlenhydrate, mehrwertige Alkohole, Aminosäuren oder Lipide.
6. Vakzine nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die isotonisch machende Substanz ein Zucker ist.

7. Vakzine nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die isotonisch machende Substanz ein Zuckeralkohol ist.
8. Vakzine nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Zuckeralkohol Sorbit ist.
9. Vakzine nach einem der Ansprüche 4 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die isotonisch machende Substanz in einer Konzentration vorliegt, so daß die resultierende Lösung isotonisch oder leicht 10 hypotonisch ist.
10. Vakzine nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Zucker- bzw. Zuckeralkoholkonzentrationen liegen im Bereich von ca. 200 - 400 mM liegt.
11. Vakzine nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, 15 daß die Konzentration 250 - 300 mM beträgt.
12. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich einen Puffer enthält.
13. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch 20 gekennzeichnet, daß sie als Antigen ein Peptid enthält.
14. Vakzine nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid von einem Tumorantigen abgeleitet ist.
- 25 15. Vakzine nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Adjuvans ein Polykation enthält.

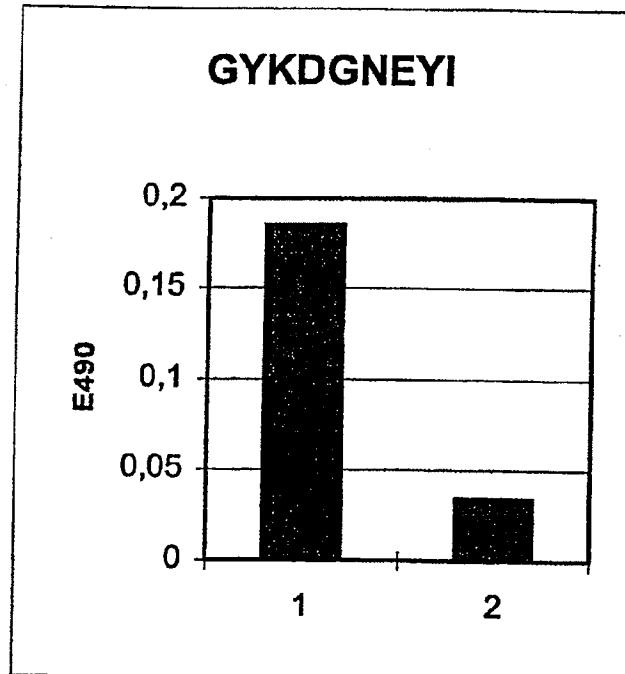
16. Vakzine nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet,  
daß sie als Adjuvans Polyarginin enthält.

1/3  
Fig. 1

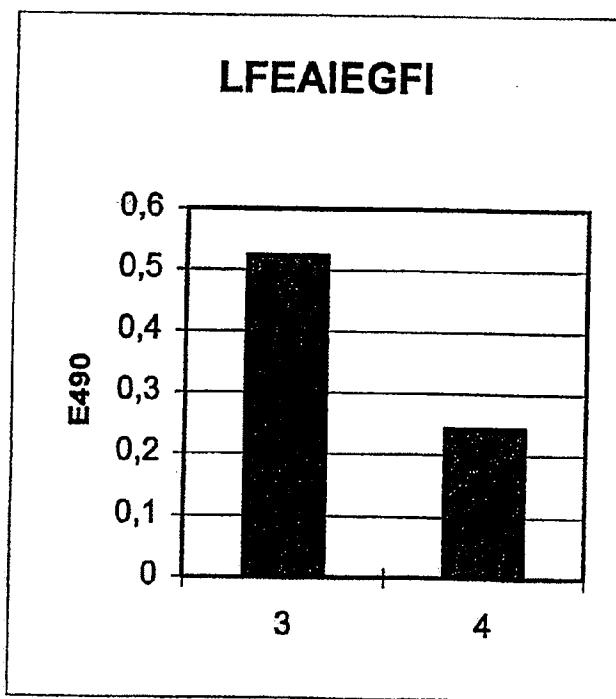


2/3  
Fig.2

A



B



**3/3**  
**Fig. 3**

